



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**TRABAJO FIN DE GRADO**  
**TÍTULO: CRISTALOGRAFÍA APLICADA A**  
**LA LUCHA FRENTE AL CÁNCER**

Autor: Francisco Javier Arroyo Ródenas

D.N.I.: 51475885E

Tutor: María Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado

Convocatoria: Febrero

## 1. RESUMEN/*ABSTRACT*.

El cáncer es una de las enfermedades con mayor incidencia y mortalidad en la actualidad. Cada tumor se comporta de forma diferente en función del estadio del mismo y del órgano u órganos afectados. Esto ha hecho que haya sido necesario desarrollar diversas líneas de investigación para intentar abordar su curación. Se ha visto que, en el mecanismo de formación y expansión de los tumores neuroepiteliales y mesenquimatosos, puede estar implicada una estructura intermediaria del DNA conocida como unión de Holliday o “Holliday junction”. El objetivo de este trabajo ha sido el de adquirir las competencias teóricas y prácticas necesarias para conseguir cristalizar oligonucleótidos con la unión de Holliday, empleando para ello algunas condiciones que habían demostrado funcionar bien en el pasado. El resultado ha sido exitoso gracias a la obtención de cristales a concentraciones medias de 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD), tanto en presencia de cloruro magnésico como de cloruro cálcico. Los resultados obtenidos avalan a la cristalografía como técnica de elucidación estructural de macromoléculas y permiten ser optimistas respecto a la futura obtención de nuevos ligandos que empleen la unión de Holliday como diana terapéutica para tratar estos tipos de cáncer.

*Cancer is one of the most important diseases nowadays, with a high incidence and mortality. Each tumour behaves in a different way depending on the stage and the organ or organs affected. For that reason, developing various scientific strategies has been necessary in order to approach a cure. Some studies have proved that a specific DNA structure, known as Holliday junction, is actually involved in formation and growth mechanisms of neuroepithelial and mesenchymal tumours. The main goal to achieve with this paper was the acquisition of enough theoretical and practical knowledge to get crystals from oligonucleotides with the Holliday junction structure, testing some of the conditions that had worked before. We can say, with no doubt, that the project has been successful, because we crystallised the oligos with medium 2-methyl-2,4-pentanediol (MPD) concentrations and both magnesium and calcium chloride. Results have proved that crystallography is a really useful tool to elucidate macromolecular structures and make us feel optimistic about the future discovery of new ligands that may target the Holliday junction and cure these cancers.*



## **2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.**

El cáncer es una de las enfermedades con mayor morbilidad y mortalidad en nuestro planeta (en 2012 se registraron 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con esta enfermedad). Además, se prevé que el número de casos aumente en aproximadamente un 70% durante los próximos veinte años (1).

Dentro del ámbito oncológico, cada tumor se comporta de forma diferente en función del estadio del mismo y del órgano afectado. Esto hace que sea necesario emplear diferentes tratamientos en la cura de los diferentes tipos de cáncer. Por ello, resulta de vital importancia el desarrollo de nuevos tratamientos alternativos capaces de eliminar las células tumorales minimizando al máximo posible el daño efectuado sobre el paciente.

Con el objetivo de alcanzar una mayor selectividad a la hora de tratar esta enfermedad, la química estructural se ha convertido en los últimos años en una herramienta clave para entender las interacciones físicas y químicas que se producen entre los fármacos empleados y sus correspondientes dianas farmacológicas.

### **2.1. La unión de Holliday**

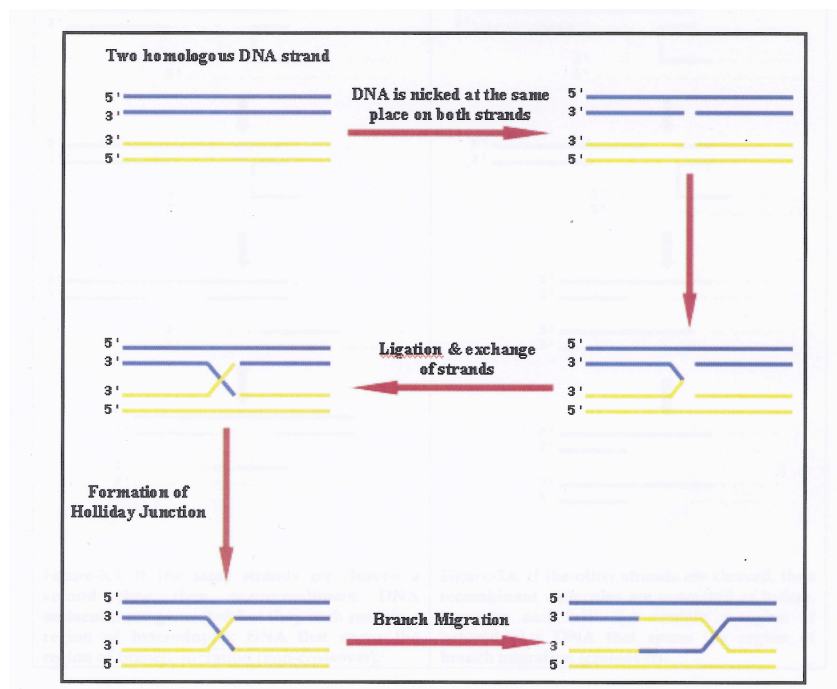
El estudio del DNA desde el punto de vista estructural se ha convertido en una prioridad científica en los últimos años desde que, en 1953, Watson y Crick propusieran su modelo de la doble hélice de DNA (2).

Desde entonces, se ha descubierto que las moléculas de DNA son muy polimórficas y pueden plegarse obteniendo estructuras mas complejas. Una de estas estructuras es la conocida como unión de Holliday o “Holliday junction”. La unión de Holliday ha sido reconocida como una estructura intermediaria empleada por las células para efectuar recombinaciones homólogas de DNA durante la división celular (3). Esta estructura puede ser doble o simple y se forma por el entrecruzamiento de cuatro cadenas de DNA durante el proceso de apareamiento de cromosomas homólogos en la meiosis o entre cromátidas hermanas de un mismo cromosoma durante la mitosis (4).

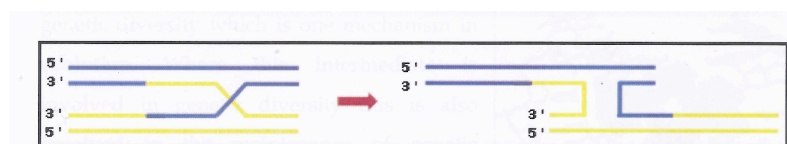
El proceso comienza con la ruptura de una de las dos cadenas de cada hebra. Posteriormente, se produce el intercambio de cadenas cortadas entre las dos hebras y la ligación correspondiente formándose la unión de Holliday, que migra a lo largo de las mismas (Figura 1). Tras el desdoblamiento de las cadenas (Figura 2), es más fácil visualizar el paso

posterior de eliminación de la unión de Holliday formada. Este paso es esencial para que pueda continuar el proceso de división celular.

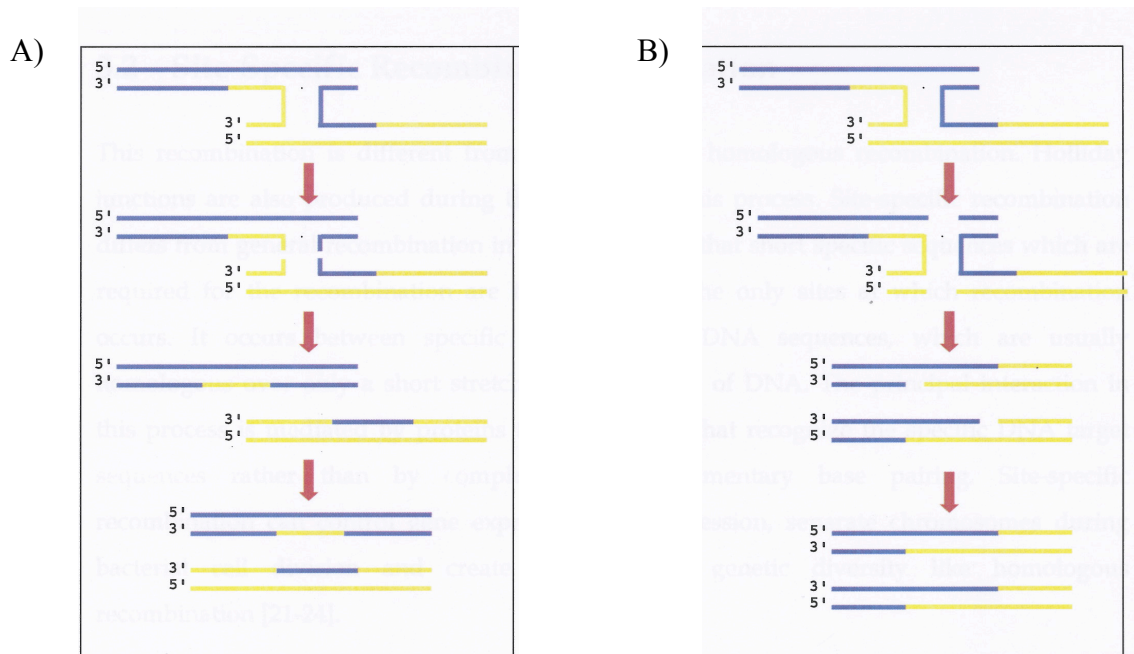
Si en el proceso de resolución de la unión de Holliday se produce el corte en las cadenas interiores, no hay entrecruzamiento, por lo que se origina una pequeña variabilidad genética asociada al gen o genes intercambiados (Figura 3A). Si en dicho proceso, en cambio, se produce el corte en las cadenas exteriores, se produce una recombinación con entrecruzamiento de cadenas que origina una gran variabilidad genética (Figura 3B) (5).



**Figura 1.** Formación de la unión de Holliday durante la recombinación homóloga en la división celular.



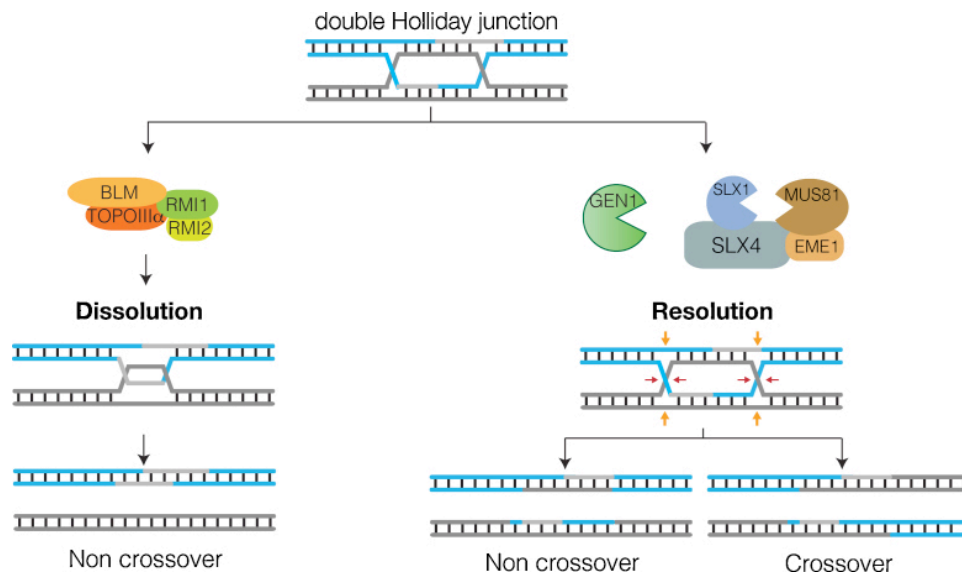
**Figura 2.** Desdoblamiento de los cuatro brazos de la unión de Holliday.



**Figura 3.** Procesamiento de la unión de Holliday siguiendo dos posibles vías diferentes: A) Disolución de la unión sin entrecruzamiento de cadenas o B) Resolución de la unión con entrecruzamiento de cadenas.

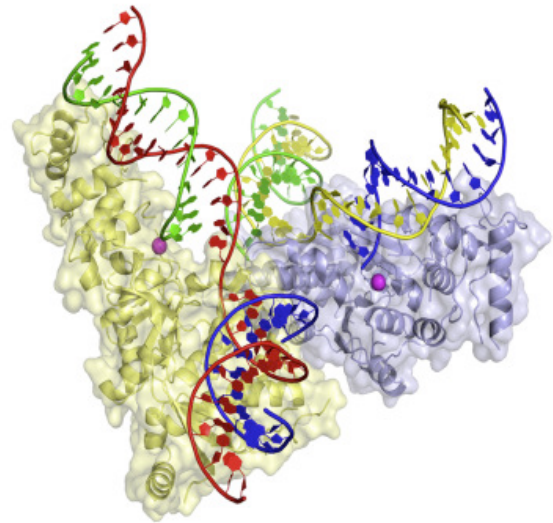
Estos entrecruzamientos son la clave de la biodiversidad genética humana, pero también constituyen uno de los mecanismos empleados por las células tumorales para proteger su integridad genética, evitando los procesos de apoptosis y extendiéndose por el organismo originando un tumor (6,7).

Por ello, las células eucariotas poseen dos mecanismos para eliminar las uniones de Holliday antes de que se produzca la segregación de cromosomas en la división celular (Figura 4). El primero de ellos se conoce como disolución de la unión de Holliday y es llevado a cabo por el complejo STR en levaduras y BTR en humanos (compuesto por cuatro enzimas: helicasa BLM, topoisomerasa III $\alpha$ , RMI1 y RMI2) (8). La disolución de uniones de Holliday lleva a un corte y reparación de cadenas sin entrecruzamiento. El otro mecanismo recibe el nombre de resolución nucleolítica y es llevado a cabo por endonucleasas selectivas (MUS81-EME1, GEN1) (9,10), que pueden originar o no entrecruzamientos entre las cadenas (11). Estas endonucleasas selectivas son conocidas como resolvasas de la unión de Holliday o “HJ resolvasas” y han sido identificadas en varios organismos, incluyendo bacteriófagos, bacterias, levaduras, arqueas y humanos (12).



**Figura 4.** Eliminación de la unión de Holliday mediante procesos de disolución o resolución enzimáticas.

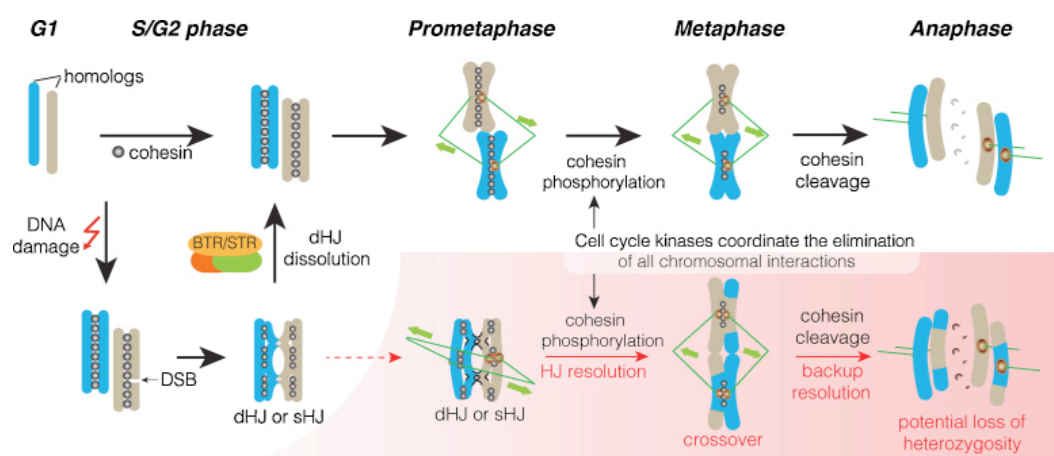
En los procesos de proliferación mitótica, la mayoría de las uniones de Holliday se procesan mediante disolución mediada por el complejo BTR, generando recombinaciones sin entrecruzamiento que permitan reparar el DNA cuando está dañado sin provocar grandes mutaciones. Por el contrario, en la meiosis, se generan tanto recombinaciones con entrecruzamiento como sin él. Las segundas tienen lugar durante las primeras etapas del ciclo celular, con el objetivo de reparar posibles errores en el DNA. Las primeras, en cambio, se encuentran mediadas por resolvasas y ocurren durante las etapas finales de la división celular, puesto que son necesarias para aumentar variabilidad genética de la nueva célula hija diploide con respecto a las dos células haploides de las que procede (13). Una de las resolvasas encargadas de eliminar la unión de Holliday en organismos eucariotas es la enzima GEN1, cuya interacción molecular con el DNA se ha elucidado gracias a su cristalización y posterior tratamiento de los cristales mediante técnicas de difracción de rayos X (Figura 5) (14).



**Figura 5.** Interacción de la enzima GEN1 con el DNA en el proceso de resolución de la unión de Holliday.

Los complejos STR (levaduras) y BTR (humanos) disuelven las uniones de Holliday en las primeras etapas del ciclo celular y no generan entrecruzamientos. Si el DNA se daña durante las etapas finales del ciclo celular o si la unión de Holliday escapa del control llevado a cabo por el complejo STR/BTR y persiste durante la fase S/G2 del ciclo, las endonucleasas aseguran la resolución de la unión de Holliday para que se produzca la segregación de cromosomas y finalice correctamente la división celular (Figura 6) (13).

En estos casos en los que la unión de Holliday se resuelve dando lugar a una recombinación con entrecruzamiento durante la mitosis, se pueden generar células mutadas con potencial para formar un tumor.



**Figura 6.** Procesamiento de las uniones de Holliday en las distintas etapas del ciclo celular. En caso de que se produzca un daño en el DNA durante las primeras etapas del ciclo, se repara el error mediante recombinación homóloga. Posteriormente, la unión de Holliday entre los cromosomas homólogos se disuelve a través del complejo BTR sin producir entrecruzamientos. En el caso de que la unión de Holliday esquive este paso o de que el daño se produzca en etapas posteriores, la unión de Holliday debe resolverse mediante endonucleasas y pueden producirse entrecruzamientos, capaces de dar lugar a células tumorales.

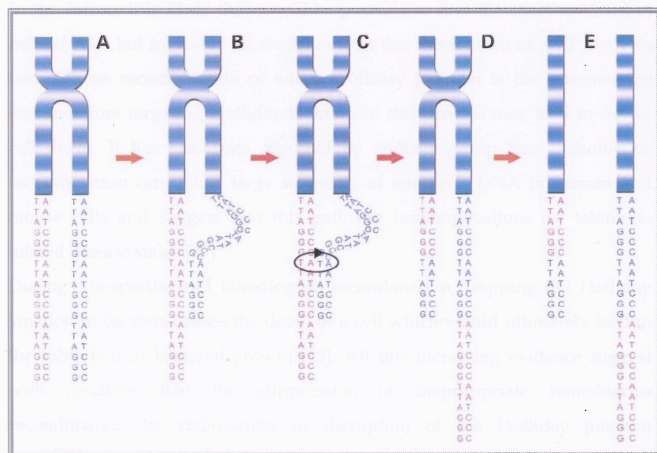
## **2.2. El papel de la unión de Holliday en el cáncer**

Durante el proceso de división, la célula debe replicar su DNA para originar dos copias idénticas, cada una de las cuales formará parte de una de las células hijas. La enzima responsable de esta replicación, una DNA polimerasa-DNA dependiente, tiene que unirse al DNA, ocupando unos cuantos oligonucleótidos. Esto lleva a la pérdida de entre 50 y 150 pares de bases por división. La pérdida de este material genético podría ocasionar mutaciones letales para la célula, por lo que a lo largo de la evolución nuestras células han incorporado secuencias repetitivas no codificantes (TTAGGG) al final de los cromosomas. Estas secuencias reciben el nombre de telómeros y se van acortando con cada división celular (15).

Cuando los telómeros se vuelven demasiado cortos, las células de nuestro organismo entran en senescencia y mueren. Esto impide la proliferación de células con posibles pérdidas de material genético. Sin embargo, las células tumorales han desarrollado mecanismos para eludir la apoptosis mediada por el acortamiento de sus telómeros (16).

El principal mecanismo se basa en la activación constitutiva de la enzima telomerasa, una transcriptasa inversa que sintetiza secuencias teloméricas de DNA empleando su propio RNA como molde.

Además, las células que forman algunos tipos de cáncer, como los neuroepiteliales y mesenquimatosos (sarcomas), han desarrollado un mecanismo alternativo de alargamiento de los telómeros no dependiente de la telomerasa (17,18). No se conoce con exactitud este mecanismo, pero se sabe que está relacionado con procesos de recombinación homóloga mediados por la unión de Holliday. En dicha recombinación, las cromátidas hermanas se alinean generalmente de forma simétrica mediante interacciones entre bases complementarias. Sin embargo, debido a que las secuencias teloméricas son muy repetitivas, una cromátida puede encontrar diferentes puntos homólogos a lo largo de la cromátida hermana y alinearse de forma no simétrica. Esto llevaría, tras el proceso de replicación, a una ganancia neta de pares de bases en una de las cromátidas y a una pérdida consecuente de pares de bases en la cromátida hermana (Figura 7).



**Figura 7.** Posible recombinación homóloga entre puntos asimétricos de dos cromátidas hermanas durante el proceso de alargamiento de los telómeros.

De esta forma, las células que heredan los cromosomas con telómeros alargados tienen mayor capacidad de propagarse y las células que heredan los cromosomas con telómeros cortos entran en senescencia y mueren. Desgraciadamente, a pesar de la desaparición promiscua de estas células con telómeros cortos, la población de células cancerígenas tiene la capacidad de propagarse y extender el tumor (19).

Para que todo este proceso pueda llevarse a cabo, es necesario también que se produzca un reparto desigual de cromosomas entre las células hijas. Así, una célula recibe todos los cromosomas con cromátidas largas y otra recibe todos los cromosomas cortos. Esto lleva a la creación de dos tipos de población en el tumor. Uno de ellos formado por células con



telómeros cortos destinadas a diferenciarse y otro constituido por células con telómeros largos destinadas a asegurar el continuo crecimiento y propagación del tumor.

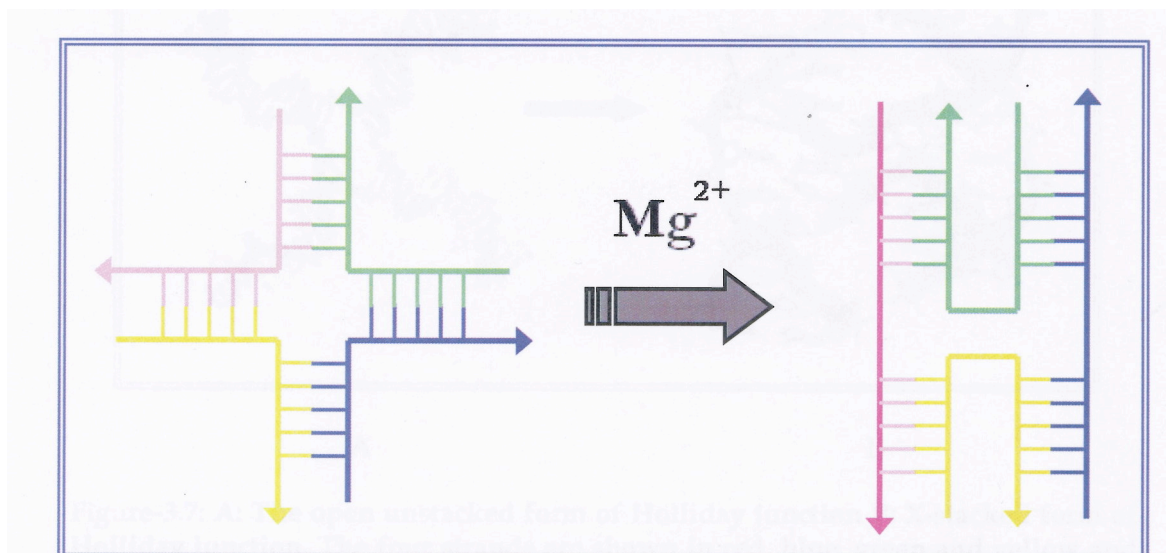
Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo de acción por el cual se produce el alargamiento alternativo de los telómeros, sí que se ha demostrado que, durante la recombinación homóloga bacteriana, el bloqueo de la unión de Holliday lleva a la muerte de la célula y, consecuentemente, a la inhibición del crecimiento bacteriano. Además, existen pruebas físicas de la formación de uniones de Holliday en los procesos de reparación de DNA de doble cadena en células eucariotas (20).

De esta forma, la unión de Holliday podría ser una interesante diana terapéutica para el tratamiento de aquellos tumores que emplean los procesos de recombinación homóloga para alargar los telómeros y evitar la apoptosis celular. En dichos tumores, ciertas moléculas podrían unirse a la unión de Holliday e impedir su resolución, paso clave para la supervivencia de la célula y la expansión del tumor.

Desde el descubrimiento de este intermedio de recombinación, se han realizado multitud de estudios con el objetivo de caracterizar la unión de Holliday con una mayor exactitud. Así, se ha observado que su geometría es altamente dinámica y que esa facilidad para cambiar podría ser vital para desarrollar su papel en la célula (21).

La unión de Holliday puede presentar varias conformaciones en disolución y la presencia de diversos cationes es clave en la estabilización de unas u otras. En condiciones de baja concentración de sales y ausencia de cationes multivalentes, los cuatro brazos de la unión de Holliday permanecen abiertos en su forma cuadrada y plana. Esto permite mantener el mayor ángulo posible entre las cadenas y minimizar la repulsión entre las cargas negativas de los grupos fosfato que forman parte del entorno de las bases nitrogenadas del DNA. Sin embargo, en presencia de altas concentraciones de cationes divalentes o multivalentes (como ocurre en condiciones fisiológicas), los brazos se doblan en una conformación en X, superando la repulsión entre cargas negativas gracias a la presencia de múltiples cationes con carga positiva.

Existe un equilibrio entre ambas conformaciones, determinado por la presencia de las sales y cationes. Así, como se muestra en la figura 8, se ha visto que los cationes de magnesio estabilizan la conformación plegada en X y desestabilizan la forma abierta, desplazando el equilibrio (22).



**Figura 8.** Estabilización de la unión de Holliday en presencia de magnesio.

La forma plegada en X es la más estable de las dos, pero no presenta la capacidad de migrar a través de las cadenas. Esta migración es necesaria para conseguir que se produzca un intercambio de genes durante el proceso de recombinación, por lo que es de vital importancia para la célula que la conformación en X sea capaz de transformarse en una conformación abierta, migre y vuelva de nuevo a la conformación estable en X. Si uno de estos pasos queda bloqueado, la unión de Holliday no se puede resolver y la recombinación no es fructífera.

Por tanto, resultaría de gran interés encontrar moléculas que se situaran en el espacio entre los brazos de la conformación en X, uniéndolos e impidiendo su apertura. Para favorecer una unión eficiente de los brazos, la molécula debería presentar una longitud y unas características muy concretas, que permitieran su correcto asentamiento en la unión y su interacción con los brazos. El diseño de una molécula así requiere una gran exactitud y precisión, por lo que es necesario conocer perfectamente la estructura de la unión de Holliday previamente. Es aquí donde la química estructural, y más concretamente la cristalografía, juegan un importante papel a la hora de realizar un exhaustivo estudio molecular de la misma.

### **2.3. Cristalización**

La cristalografía es una técnica estructural muy importante a la hora de analizar las uniones entre un ligando y su diana. Los cristales son estructuras regulares en tres dimensiones que se forman durante el proceso de precipitación de átomos o moléculas. Estas estructuras presentan una energía libre inferior a la de la forma amorfa y se forman por la



unión, mediante enlace no covalente, de dichos átomos o moléculas repetidamente. La unidad mínima de repetición se conoce como celda unidad, representativa de todo el cristal. Si conocemos con exactitud la celda unidad, podemos imaginar el cristal entero como un empaquetamiento de estas celdas en filas y columnas uniformes en las tres dimensiones del espacio (23).

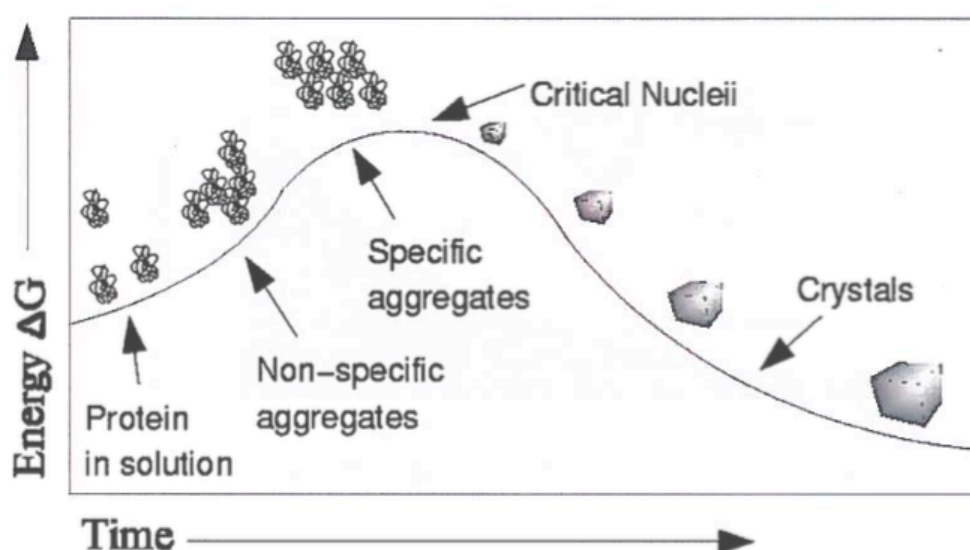
Desde el punto de vista morfológico, no se presentan grandes diferencias entre los cristales macromoleculares y los formados por pequeñas moléculas. Sin embargo, los macromoleculares son más pequeños que éstos últimos, excediendo raramente los  $10\text{ }\mu\text{m}^3$ , por lo que deben ser examinados al microscopio. Además, presentan pobres propiedades mecánicas y un alto contenido de disolvente (desde un 20 hasta un 80%). Esta elevada proporción de disolvente, junto con las débiles interacciones entre las macromoléculas, provoca que los cristales sean extremadamente frágiles y sensibles a las condiciones externas. Por esta razón, los cristales macromoleculares deben mantenerse siempre en un ambiente sobresaturado de disolvente y a una temperatura determinada, evitando así que se deshidraten y se destruyan (24).

El proceso de cristalización de moléculas de cualquier compuesto es un equilibrio entre la forma disuelta del compuesto y la forma precipitada. En condiciones normales de saturación, la forma disuelta presenta una menor energía libre, por lo que es la forma más estable. En cambio, un aumento en la cantidad de soluto o una disminución en la cantidad de disolvente pueden llevar a un estado de sobresaturación, en el cual el disolvente es incapaz de mantener hidratadas todas las moléculas de soluto. En este punto, las moléculas de soluto precipitan dando lugar a dos fases más estables: una fase en la que parte de las moléculas están todavía disueltas y una fase en la que la otra parte de las moléculas se encuentra formando un Precipitado amorfo.

En todo proceso de cristalización encontramos tres etapas: nucleación, crecimiento y cese del crecimiento (Figura 9). La nucleación es el proceso por el cual las moléculas y los agregados no cristalinos disueltos se unen para formar agregados termodinámicamente estables y con una estructura ordenada. Estos agregados deben presentar un tamaño mínimo (tamaño crítico) para convertirse en un núcleo supercrítico, capaz de seguir creciendo. Este tamaño crítico viene definido por una proporción superficie/volumen determinada. En caso de que los núcleos no superen este tamaño mínimo, se produce una redisolución espontánea de los mismos (25).

Una vez que se han formado los núcleos supercríticos, el grado de sobresaturación debe mantenerse al mínimo para favorecer su crecimiento. Un elevado grado de sobresaturación llevaría a la formación muchos cristales de pequeño tamaño y calidad. Por el contrario, al mantener un grado de sobresaturación adecuado, los cristales crecen lentamente y alcanzan un mayor tamaño y orden, por lo que son cristales de mayor calidad.

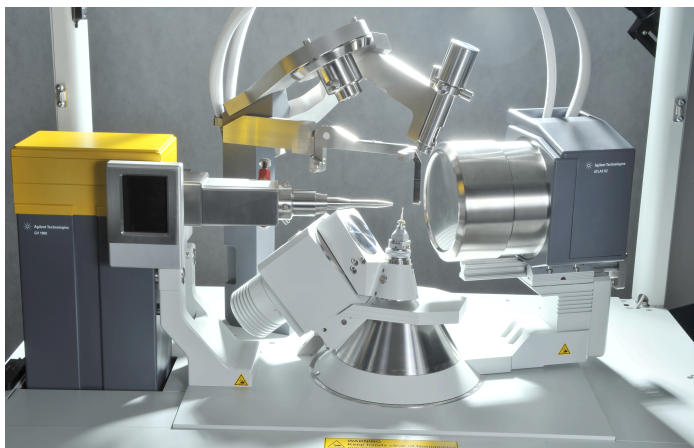
En un momento determinado, los cristales dejan de crecer y mantienen su tamaño. Esto se produce principalmente al alcanzar un punto en el que la baja concentración de soluto lleva a un equilibrio entre la forma cristalizada y la forma disuelta. Llegados a este punto, el proceso de cristalización puede darse por concluido (25,26).



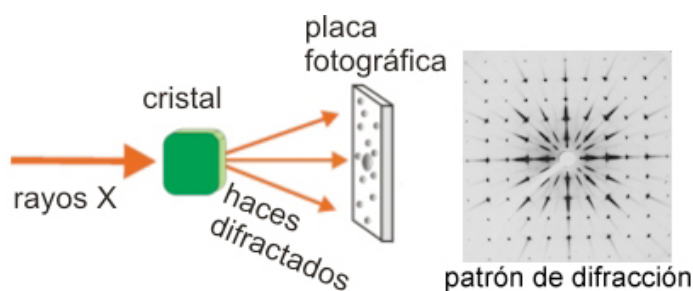
**Figura 9.** Diagrama de las etapas del proceso de cristalización. La formación de agregados requiere de un aumento de la energía libre del sistema hasta llegar a un punto crítico en el que se forman los núcleos. A partir de entonces, el proceso crecimiento de los cristales a partir de los núcleos se ve favorecido termodinámicamente por un descenso brusco de la energía libre. Cuando se alcanza un equilibrio entre el soluto de los cristales y de la disolución, se produce el cese de su crecimiento y, a partir de ese momento, el tamaño de los mismos permanece constante.

Una vez que conseguimos aislar los cristales obtenidos, éstos pueden ser introducidos en un difractómetro de rayos X (Figura 10). Ésta técnica nos puede permitir inferir la estructura de las macromoléculas que forman el cristal mediante un análisis cuantitativo detallado de los patrones de difracción de un haz de rayos X que atraviesa la muestra. Se emplea frecuentemente en química estructural y bioquímica para determinar la estructura de moléculas de DNA y proteínas.

**Figura 10.** Difractómetro de rayos X Agilent GV 1000 con detector CCD Atlas S2 (Fotografía de Business Wire).



Tras colocar el cristal en un soporte con forma de anilla, un haz de rayos X es emitido por el difractómetro y atraviesa el cristal, que debe colocarse con una orientación muy precisa. Los rayos X son difractados por los electrones de los átomos que forman el cristal y chocan contra una placa fotográfica o detector CCD, que graba el patrón de puntos originado (Figura 11). Es importante recalcar que son los electrones los que difractan el haz de rayos X, por lo que realmente se obtiene un mapa de la densidad de electrones de la molécula estudiada. La obligación de emplear cristales reside en el hecho de que un solo electrón no es capaz de difractar suficiente radiación para que captada por el detector. Sin embargo, los cristales están formados por muchas moléculas repetidas de forma simétrica. Al emitir un haz sobre el cristal, el patrón de difracción se repite tantas veces como moléculas haya y, al presentar la misma longitud de onda, sus intensidades se suman para dar lugar a una única señal detectable.

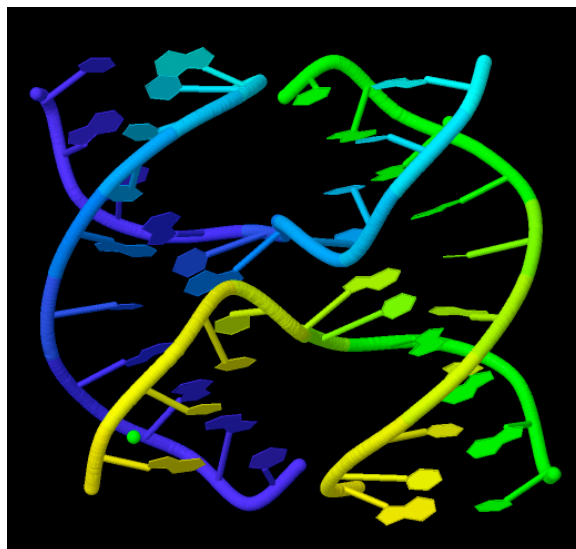


**Figura 11.** Esquema del proceso de difracción de rayos X

Posteriormente, a través de la transformada de Fourier, los datos medidos se pasan del espacio recíproco al espacio real. La compleja ecuación resultante describe la densidad electrónica de la celda unidad del cristal. Las zonas de elevada densidad electrónica corresponden con las posiciones de los átomos que conforman la molécula, por lo que la tarea

final del cristalógrafo consiste en interpretar el mapa obtenido y deducir posibles conexiones entre los átomos para inferir la estructura de la macromolécula, ayudándose para ello de avanzados programas informáticos (Figura 12) (27).

**Figura 12.** Construcción de la Unión de Holliday mediante software informático.



### 3. OBJETIVOS.

Hasta hace poco, la cristalización de macromoléculas era prácticamente empírica. Su impredecibilidad y frecuente falta de reproducibilidad han hecho que se la considere más un “arte” que una verdadera ciencia. A esto hay que sumarle el hecho de que el tiempo de formación de cristales macromoleculares es difícil de calcular y puede ir desde algunos días hasta varios meses, por lo que debe haber continuamente una persona supervisando su correcto desarrollo en unas condiciones adecuadas.

Durante los últimos veinte años ha surgido la necesidad de comprender más profundamente esta técnica para emplear su verdadero potencial. El mayor hándicap reside en la ausencia de fuentes y protocolos de cristalización de fragmentos de DNA. Esto hace que sea necesario adaptar protocolos empleados con proteínas y cambiar ciertos componentes y condiciones para que sean válidos en la cristalización de DNA.

Con este trabajo teórico-experimental, se han intentado desarrollar los siguientes objetivos:

- Proporcionar un enfoque teórico global acerca de la cristalización y su posible utilidad en el descubrimiento de nuevas moléculas para tratar algunos tipos de tumores.

- Profundizar en la importancia de caracterizar estructuralmente algunas conformaciones del DNA que presentan un gran potencial para constituir dianas terapéuticas, como la Unión de Holliday.
- Comprobar la reproducibilidad a la hora de cristalizar oligonucleótidos utilizando condiciones empleadas con éxito previamente.

#### 4. METODOLOGÍA.

A la hora de precipitar, las moléculas pueden adoptar una estructura amorfa o formar núcleos cristalinos. La formación de precipitados amorfos se encuentra favorecida cinéticamente, por lo que es necesario dar con unas condiciones ideales de precipitación lenta y controlada para fomentar una adecuada cristalización (28).

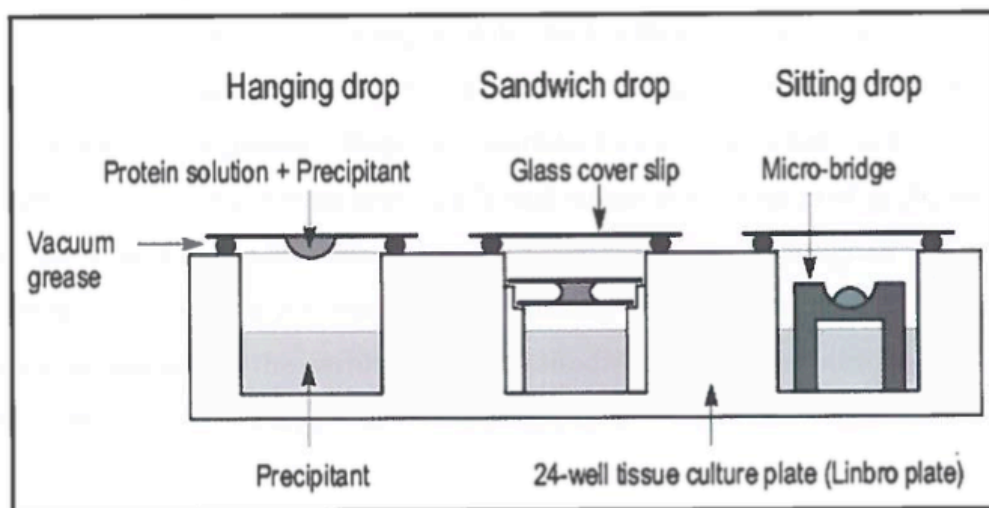
El éxito o fracaso durante la cristalización de macromoléculas puede venir dado por algunos factores que son críticos en el proceso:

- a) Pureza: A pesar de que se pueden formar cristales a partir de soluciones con impurezas, éstos suelen proporcionar malos resultados durante la difracción posterior. Por ello, es importante trabajar con reactivos y soluciones con la máxima pureza posible.
- b) Precipitantes: Las sustancias precipitantes actúan sobre la interfase disolvente-macromoléculas, favoreciendo la precipitación de estas últimas. Los agentes precipitantes más empleados son los alcoholes, especialmente el 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD). En algunos casos, también se emplea polietilenglicol (PEG) de elevado peso molecular (4000-8000).
- c) Temperatura: La estabilidad térmica de los ácidos nucleicos permite trabajar en un amplio intervalo de temperaturas (desde los 4 a los 30-35°C). Normalmente, una menor temperatura lleva a la formación de mejores cristales, pero la óptima varía en función de los materiales específicos empleados.
- d) pH: Parece ser que, al trabajar con DNA, presenta menor importancia que con proteínas. Se suele emplear un tampón o “buffer” para regular el pH y evitar el crecimiento bacteriano(28). El más empleado es el cacodilato sódico  $[\text{Na}^+((\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2)^-]$ , cuyo rango de pH está comprendido entre 6 y 7.

- e) Aditivos: Se emplean generalmente cationes y poliaminas, como la espermina o la hexamina de cobalto, para neutralizar las cargas negativas de los grupos aniónicos presentes en el entorno de los ácidos nucleicos. Esto favorece la obtención de conformaciones cerradas en forma de X más estables.

Con el fin de obtener cristales con calidad suficiente para ser difractados, se han desarrollado un gran número de técnicas. De todas ellas, la de difusión de vapor es la más empleada. Se basa en la obtención de un sistema sobresaturado de macromoléculas a partir de procesos de evaporación y difusión de agua entre disoluciones de diferente concentración. Una de ellas es una gota que contiene la macromolécula que se quiere cristalizar junto con el “buffer”, el agente precipitante y los aditivos. La otra es un reservorio de agente precipitante a una concentración mayor de la que hay en la gota. Ambas disoluciones se encuentran aproximadamente a un centímetro de distancia, por lo que el vapor de agua puede fluir desde la disolución con menor concentración de agente precipitante (la gota) hasta la disolución con mayor concentración del mismo (el reservorio). Así, el volumen de la gota disminuye con el tiempo, favoreciendo la sobresaturación de macromoléculas y la precipitación de las mismas en forma de cristales (24).

La técnica de cristalización basada en el intercambio de vapor de agua puede desarrollarse siguiendo uno de los siguientes métodos: gota colgada, gota en sándwich y gota depositada (Figura 13).



**Figura 13.** Métodos de cristalización basados en el intercambio de vapor entre la gota y el reservorio: 1. Gota colgada o “hanging drop”, 2. Gota en sándwich o “sándwich drop” y 3. Gota depositada o “sitting drop”.

De todos ellos, el que se empleó en este trabajo fue el método de la gota colgada, que es el recomendado cuando se trabaja con gotas pequeñas (1-20  $\mu$ l). La forma de la gota es importante, pues afecta al número de nucleaciones y al tamaño de los cristales. Si la disolución no contiene detergentes o disolventes orgánicos, es posible formar gotas esféricas que permitan obtener buenos resultados.

Para elaborar los cristales se emplearon placas de 24 pocillos de 1,5 cm de diámetro como los que se muestran en la figura 14.

En cada pocillo se colocaron 500  $\mu$ l de la disolución de precipitación, que actúa como reservorio. Esta disolución se compone de:

- Sal: Ayuda a estabilizar la Unión de Holliday. Suele emplearse cloruro cálcico o cloruro magnésico.
- Cacodilato de sodio a pH 6,5: Es un buffer que permite mantener el pH deseado.
- MPD (2-metil-2,4-pentanodiol): Es el agente precipitante que favorece la formación de los cristales. Es crítico en el tiempo de formación y en la calidad de los cristales formados.



**Figura 14.** Placas de 24 pocillos utilizadas para elaborar cristales.

Una vez depositada la disolución en cada pocillo, se procedió a formar las gotas con las secuencias de oligonucleótidos que se querían cristalizar. Para ello, se creó una disolución con dos secuencias complementarias de oligonucleótidos (5'-TTAGGGTTAG-3' y 3'-ATCCCAATC-5') a 1 mM y un “buffer” compuesto por cacodilato de potasio (20 mM) y cloruro de potasio (50 mM) a pH 6,5.

Posteriormente, se formaron las gotas en el cubreobjetos mezclando 1  $\mu$ l de disolución precipitante del pocillo y 2  $\mu$ l de disolución problema con los oligonucleótidos. Este paso se realizó tantas veces como condiciones distintas se plantearon.

Por último, se les dio la vuelta a los cubreobjetos y se depositaron sobre los pocillos, en los cuales ya se habían colocado los 500  $\mu$ l de disolución precipitante a modo de reservorio. Dichos pocillos fueron engrasados por los bordes previamente para sellar la unión con el cubreobjetos. Los platos completamente elaborados se conservaron en una cámara a 18°C.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Debido a que la formación de cristales de nucleótidos es muy sensible a las condiciones del medio en el que se desarrollan, se elaboró una batería de condiciones diferentes con el objetivo de determinar cuáles eran las más propicias para el adecuado crecimiento de dichos cristales.

Así, se emplearon dos sales diferentes: cloruro magnésico a baja y alta concentración (50 y 150 mM respectivamente) y cloruro cálcico también a baja y alta concentración (20 y 80 mM respectivamente). Además, se emplearon concentraciones crecientes de MPD desde un 35 hasta un 50% (35%, 38%, 41%, 44%, 47%, 50%). La concentración de MPD es un factor crítico en el proceso, pues determina la velocidad de cristalización y la calidad de los cristales. Una concentración demasiado baja puede llevar a cristalizaciones muy largas en las que los oligonucleótidos utilizados se degraden. Por el contrario, una concentración de MPD demasiado elevada puede ocasionar una precipitación repentina en pequeños cristales de baja calidad. Por ello, se establecen estos gradientes de concentración del agente precipitante, con el objetivo de alcanzar una velocidad óptima de cristalización con una concentración de MPD determinada.

El cacodilato de sodio se empleó siempre a una concentración de 40 mM, con la cual se había visto previamente que se obtenían buenos resultados (29,30).

Una vez elaborados los platos y guardados a 18°C, se fueron observando cada día durante treinta días al microscopio con el objetivo de determinar el progreso de la cristalización en cada uno de los pocillos.

En la tabla 1 se muestran las condiciones utilizadas en cada pocillo y los resultados obtenidos.

Condición		Fecha	Resultados
1	MgCl <sub>2</sub> 50 mM MPD 35% NaCaCo 40 mM	Día 1	Ausencia de cristales
		Día 5	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
		Día 15	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
		Día 30	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
2	MgCl <sub>2</sub> 50 mM MPD 38% NaCaCo 40 mM	Día 1	Ausencia de cristales
		Día 5	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
		Día 15	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
		Día 30	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
3	MgCl <sub>2</sub> 50 mM MPD 41% NaCaCo 40 mM	Día 1	Ausencia de cristales
		Día 5	Precipitado amorfo
		Día 15	Precipitado amorfo



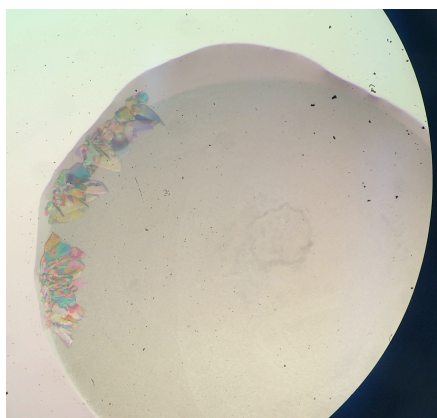
		Día 30	Precipitado amorfo
4	MgCl <sub>2</sub> 50 mM MPD 44% NaCaCo 40 mM	Día 1	Precipitado amorfo
		Día 5	Precipitado amorfo
		Día 15	Precipitado amorfo
		Día 30	Precipitado amorfo
5	MgCl <sub>2</sub> 50 mM MPD 47% NaCaCo 40 mM	Día 1	Precipitado amorfo
		Día 5	Precipitado amorfo
		Día 15	Precipitado amorfo
		Día 30	Precipitado amorfo
6	MgCl <sub>2</sub> 50 mM MPD 50% NaCaCo 40 mM	Día 1	Precipitado amorfo
		Día 5	Precipitado amorfo
		Día 15	Precipitado amorfo
		Día 30	Precipitado amorfo
7	MgCl <sub>2</sub> 150 mM MPD 35% NaCaCo 40 mM	Día 1	Ausencia de cristales
		Día 5	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
		Día 15	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
		Día 30	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
8	MgCl <sub>2</sub> 150 mM MPD 38% NaCaCo 40 mM	Día 1	Ausencia de cristales
		Día 5	Cristales de gran tamaño y buena calidad en los bordes
		Día 15	Cristales de gran tamaño y buena calidad en los bordes
		Día 30	Cristales de gran tamaño y buena calidad en los bordes
9	MgCl <sub>2</sub> 150 mM MPD 41% NaCaCo 40 mM	Día 1	Ausencia de cristales
		Día 5	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
		Día 15	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
		Día 30	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
10	MgCl <sub>2</sub> 150 mM MPD 44% NaCaCo 40 mM	Día 1	Cristales de tamaño mediano y baja calidad
		Día 5	Cristales de tamaño mediano y baja calidad
		Día 15	Cristales de tamaño mediano y baja calidad
		Día 30	Cristales de tamaño mediano y baja calidad
11	MgCl <sub>2</sub> 150 mM MPD 47% NaCaCo 40 mM	Día 1	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
		Día 5	Cristales de tamaño mediano y baja calidad
		Día 15	Cristales de tamaño mediano y baja calidad
		Día 30	Cristales de tamaño mediano y baja calidad
12	MgCl <sub>2</sub> 150 mM MPD 50% NaCaCo 40 mM	Día 1	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
		Día 5	Cristales de tamaño mediano y baja calidad
		Día 15	Cristales de tamaño mediano y baja calidad
		Día 30	Cristales de tamaño mediano y baja calidad
13	CaCl <sub>2</sub> 20 mM MPD 35% NaCaCo 40 mM	Día 1	Ausencia de cristales
		Día 5	Ausencia de cristales
		Día 15	Ausencia de cristales
		Día 30	Ausencia de cristales
14	CaCl <sub>2</sub> 20 mM MPD 38% NaCaCo 40 mM	Día 1	Ausencia de cristales
		Día 5	Ausencia de cristales
		Día 15	Ausencia de cristales

		Día 30	Ausencia de cristales
15	CaCl <sub>2</sub> 20 mM MPD 41% NaCaCo 40 mM	Día 1	Ausencia de cristales
		Día 5	Ausencia de cristales
		Día 15	Ausencia de cristales
		Día 30	Ausencia de cristales
16	CaCl <sub>2</sub> 20 mM MPD 44% NaCaCo 40 mM	Día 1	Ausencia de cristales
		Día 5	Ausencia de cristales
		Día 15	Cristales de gran tamaño y buena calidad
		Día 30	Cristales de gran tamaño y buena calidad
17	CaCl <sub>2</sub> 20 mM MPD 47% NaCaCo 40 mM	Día 1	Ausencia de cristales
		Día 5	Precipitado amorfo
		Día 15	Precipitado amorfo
		Día 30	Precipitado amorfo
18	CaCl <sub>2</sub> 20 mM MPD 50% NaCaCo 40 mM	Día 1	Ausencia de cristales
		Día 5	Precipitado amorfo
		Día 15	Precipitado amorfo
		Día 30	Precipitado amorfo
19	CaCl <sub>2</sub> 80 mM MPD 35% NaCaCo 40 mM	Día 1	Ausencia de cristales
		Día 5	Ausencia de cristales
		Día 15	Ausencia de cristales
		Día 30	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
20	CaCl <sub>2</sub> 80 mM MPD 38% NaCaCo 40 mM	Día 1	Ausencia de cristales
		Día 5	Ausencia de cristales
		Día 15	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
		Día 30	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
21	CaCl <sub>2</sub> 80 mM MPD 41% NaCaCo 40 mM	Día 1	Ausencia de cristales
		Día 5	Ausencia de cristales
		Día 15	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
		Día 30	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
22	CaCl <sub>2</sub> 80 mM MPD 44% NaCaCo 40 mM	Día 1	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
		Día 5	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
		Día 15	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
		Día 30	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
23	CaCl <sub>2</sub> 80 mM MPD 47% NaCaCo 40 mM	Día 1	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
		Día 5	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
		Día 15	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
		Día 30	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
24	CaCl <sub>2</sub> 80 mM MPD 50% NaCaCo 40 mM	Día 1	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
		Día 5	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
		Día 15	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad
		Día 30	Cristales de pequeño tamaño y baja calidad

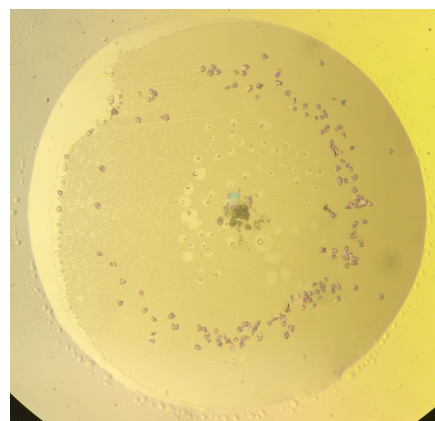
**Tabla 1.** Condiciones y resultados obtenidos en la cristalización.

Tras la observación de los platos de cristalización durante un mes, pudimos concluir que las concentraciones altas de MPD (por encima del 45%) llevan a una precipitación rápida con la consecuente formación de muchos cristales pequeños. Estos cristales no presentan suficiente tamaño como para ser difractados, pues se romperían al instante y se obtendrían medidas con una calidad muy pobre. Por el contrario, concentraciones muy bajas de MPD (por debajo del 38%) llevan a una precipitación demasiado lenta con degradación de los materiales de partida.

En cuanto a las sales, la otra variable estudiada, se pudo observar que tanto el cloruro de magnesio como el cloruro de calcio han dado buenos resultados, aunque a diferente concentración (150 mM para el  $MgCl_2$  y 20 mM para el  $CaCl_2$ ). Las figuras 15 y 16 muestran los mejores cristales obtenidos y las condiciones que permitieron conseguir estos resultados.



**Figura 15.** Cristales de gran tamaño en el lateral del pocillo (día 5 de observación). Condiciones: 150 mM de  $MgCl_2$ , 40 mM de NaCaCo y 38% de MPD.



**Figura 16.** Cristales de tamaño y calidad suficientes para obtener datos con precisión (día 15 de observación). Condiciones: 20 mM de  $CaCl_2$ , 40 mM de NaCaCo y 44% de MPD.

## 6. CONCLUSIONES.

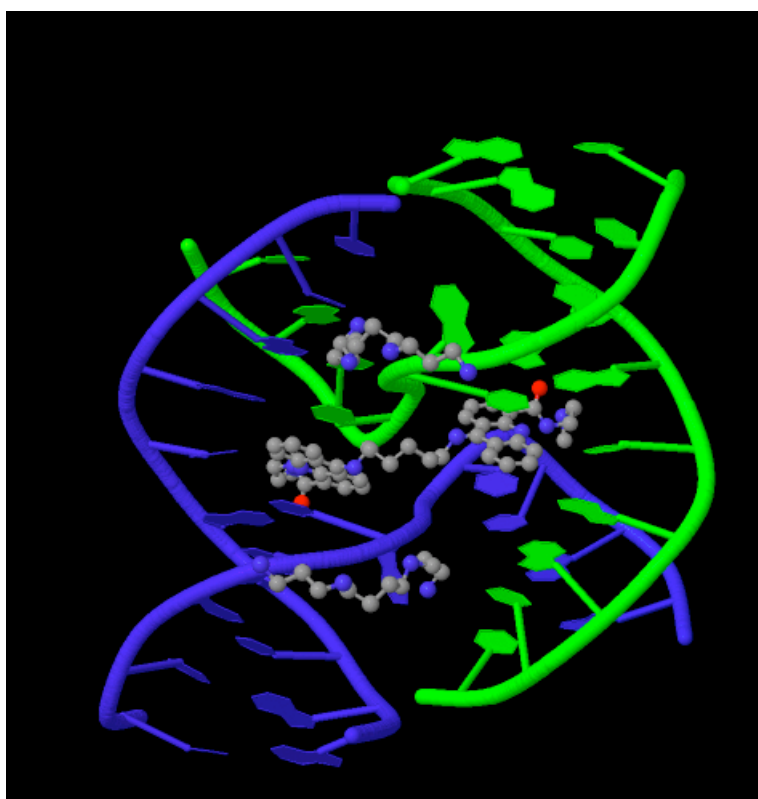
Tras la obtención y aislamiento de cristales de oligonucleótidos con estructura de unión de Holliday con dos de las condiciones probadas, podemos afirmar que se han cumplido todos los objetivos propuestos, tanto teóricos como experimentales.

A lo largo del trabajo es posible hacerse una idea de la gran utilidad que presenta la cristalización como técnica de elucidación estructural de macromoléculas, así como de la importancia de conocer con detalle posibles nuevas dianas terapéuticas para actuar de forma más eficiente y selectiva sobre las células tumorales.

El hecho de haber sido capaces de reproducir algunas de las condiciones de cristalización de los oligonucleótidos, a pesar de la inestabilidad de la unión de Holliday, otorga además una mayor credibilidad a la cristalografía como herramienta científica y le abre las puertas a su utilización también en un futuro.

Una vez conocida la estructura de la unión de Holliday, futuras investigaciones podrían ir encaminadas a diseñar ligandos capaces de unirse a ella para romperla o para fijarla e impedir su migración. A día de hoy, se ha conseguido cristalizar una estructura de unión de Holliday con un ligando intercalado en ella (Figura 17) (30), lo que nos permite ser optimistas a la hora de buscar nuevas moléculas que sean capaces de unirse también a dicha estructura.

Posteriormente, un estudio más exhaustivo de las interacciones entre dichos ligandos y la unión de Holliday podría permitir optimizar su estructura y obtener potenciales fármacos para tratar gran parte de los tumores neuroepiteliales y mesenquimatosos.



**Figura 17.** Molécula de bis-acridina intercalada en la unión de Holliday. Los tres anillos coplanares de la molécula se sitúan paralelos a las bases nitrogenadas del DNA, posiblemente interaccionando con ellas mediante enlaces hidrofóbicos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

1. OMS. Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles en 2014. 15 de noviembre de 2015. <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>
2. Watson, J.D. and Crick, F.H. (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, **171**, 737-738.
3. Holliday, R. (1964) The Induction of Mitotic Recombination by Mitomycin C in *Ustilago* and *Saccharomyces*. *Genetics*, **50**, 323-335.
4. Oke, A., Anderson, C.M., Yam, P. and Fung, J.C. (2014) Controlling meiotic recombinational repair - specifying the roles of ZMMs, Sgs1 and Mus81/ mMs4 in crossover formation. *PLoS genetics*, **10**, e1004690.
5. McKinney, S.A., Freeman, A.D., Lilley, D.M. and Ha, T. (2005) Observing spontaneous branch migration of Holliday junctions one step at a time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 5715-5720.
6. Yu, J., Ha, T. and Schulten, K. (2004) Conformational model of the Holliday junction transition deduced from molecular dynamics simulations. *Nucleic acids research*, **32**, 6683-6695.
7. Watson, J., Hays, F.A. and Ho, P.S. (2004) Definitions and analysis of DNA Holliday junction geometry. *Nucleic acids research*, **32**, 3017-3027.
8. Xue, X., Raynard, S., Busygina, V., Singh, A.K. and Sung, P. (2013) Role of replication protein A in double holliday junction dissolution mediated by the BLM-Topo IIIalpha-RMI1-RMI2 protein complex. *The Journal of biological chemistry*, **288**, 14221-14227.
9. Sarbajna, S., Davies, D. and West, S.C. (2014) Roles of SLX1-SLX4, MUS81-EME1, and GEN1 in avoiding genome instability and mitotic catastrophe. *Genes & development*, **28**, 1124-1136.
10. Garcia-Luis, J. and Machin, F. (2014) Mus81- mMs4 and Yen1 resolve a novel anaphase bridge formed by noncanonical Holliday junctions. *Nature communications*, **5**, 5652.
11. Chan, Y.W. and West, S. (2015) GEN1 promotes Holliday junction resolution by a coordinated nick and counter-nick mechanism. *Nucleic acids research*, **43**, 10882-10892.
12. Wyatt, H.D. and West, S.C. (2014) Holliday junction resolvases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **6**, a023192.
13. Matos, J. and West, S.C. (2014) Holliday junction resolution: regulation in space and time. *DNA repair*, **19**, 176-181.
14. Liu, Y., Freeman, A.D., Declais, A.C., Wilson, T.J., Gartner, A. and Lilley, D.M. (2015) Crystal Structure of a Eukaryotic GEN1 Resolving Enzyme Bound to DNA. *Cell reports*, **13**, 2565-2575.
15. Bernadotte, A., Mikhelson, V.M. and Spivak, I.M. (2016) Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging*.
16. Henson, J.D., Neumann, A.A., Yeager, T.R. and Reddel, R.R. (2002) Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene*, **21**, 598-610.

17. Compton, S.A., Choi, J.H., Cesare, A.J., Ozgur, S. and Griffith, J.D. (2007) Xrcc3 and Nbs1 are required for the production of extrachromosomal telomeric circles in human alternative lengthening of telomere cells. *Cancer research*, **67**, 1513-1519.
18. Costa, A., Daidone, M.G., Daprai, L., Villa, R., Cantu, S., Pilotti, S., Mariani, L., Gronchi, A., Henson, J.D., Reddel, R.R. *et al.* (2006) Telomere maintenance mechanisms in liposarcomas: association with histologic subtypes and disease progression. *Cancer research*, **66**, 8918-8924.
19. Dilley, R.L. and Greenberg, R.A. (2015) ALternative Telomere Maintenance and Cancer. *Trends in cancer*, **1**, 145-156.
20. Bzymek, M., Thayer, N.H., Oh, S.D., Kleckner, N. and Hunter, N. (2010) Double Holliday junctions are intermediates of DNA break repair. *Nature*, **464**, 937-941.
21. Hays, F.A., Watson, J. and Ho, P.S. (2003) Caution! DNA crossing: crystal structures of Holliday junctions. *The Journal of biological chemistry*, **278**, 49663-49666.
22. Ferapontova, E.E., Mountford, C.P., Crain, J., Buck, A.H., Dickinson, P., Beattie, J.S., Ghazal, P., Terry, J.G., Walton, A.J. and Mount, A.R. (2008) Electrochemical control of a DNA Holliday Junction nanoswitch by Mg<sup>2+</sup> ions. *Biosensors & bioelectronics*, **24**, 422-428.
23. Blow, D. (2002) *Outline of Crystallography for Biologists*. 1st ed. Oxford University Press, New York.
24. Ducruix, A.G., R. (1999) *Crystallisation of Nucleic Acids and Proteins, A practical approach*. 2nd ed. Oxford University Press
25. McPherson, A. (1999) *Crystallisation of biological macromolecules*. 1st ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
26. Sauter, A., Roosen-Runge, F., Zhang, F., Lotze, G., Jacobs, R.M. and Schreiber, F. (2015) Real-time observation of nonclassical protein crystallization kinetics. *Journal of the American Chemical Society*, **137**, 1485-1491.
27. Drenth, J. (2007) *Principles of X-ray Crystallography*. 3rd ed. Springer-Verlag New York, New York.
28. Weber, P.C. (1991) Physical principles of protein crystallization. *Advances in protein chemistry*, **41**, 1-36.
29. Mandal, P.K., Venkadesh, S. and Gautham, N. (2011) Structure of d(CGGGTACCCG)<sub>4</sub> as a four-way Holliday junction. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization co mMunications*, **67**, 1506-1510.
30. Brogden, A.L., Hopcroft, N.H., Searcey, M. and Cardin, C.J. (2007) Ligand bridging of the DNA Holliday junction: molecular recognition of a stacked-X four-way junction by a small molecule. *Angewandte Chemie*, **46**, 3850-3854.